

BIOACCESSIBILITAT DE NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES INCORPORADES EN RECOBRIMENTS COMESTIBLES SOBRE MATRIUS ALIMENTÀRIES



Universitat de Lleida

Autor: Karen López Sotillo

Tutor: Isabel Odriozola Serrano

Facultat de Medicina

**Grau de Nutrició Humana i
Dietètica**

1 de Setembre del 2015

BIOACCESSIBILITAT DE NANOPARTÍCULES LIPÍDIQUES INCORPORADES EN RECOBRIMENTS COMESTIBLES SOBRE MATRIUS ALIMENTÀRIES

Treball de final de grau presentat per: Karen López Sotillo

Tutoritzat per: Isabel Odriozola Serrano

ÍNDEX

| | |
|---|----|
| 1. RESUM | 5 |
| 2. INTRODUCCIÓ | 8 |
| 2.1. Components bioactius: β -carotè i vitamina E | 8 |
| 2.1.1. β -carotè | 8 |
| 2.1.2. -Vitamina E | 10 |
| 2.2. Nanotecnologia i nanoemulsions | 11 |
| 2.3 Components d'una nanoemulsió | 12 |
| 2.4. Recobriments comestible i aliments trossets | 16 |
| 3. JUSTIFICACIÓ | 18 |
| 4. OBJECTIUS | 19 |
| 4.1. Objectiu general: | 19 |
| 4.2. Objectius específics: | 19 |
| 5. METODOLOGIA | 20 |
| 5.1. Materials | 20 |
| 5.2. Mètodes | 21 |
| 5.2.1. Preparació de l'oli enriquit | 21 |
| 5.2.2. Preparació i formació de la nanoemulsió | 21 |
| 5.2.3. Caracterització de la nanoemulsió i emulsió convencional | 22 |
| 5.2.4. Recobriment dels aliments | 25 |
| 5.2.5. Digestió in vitro de l'aliment recobert | 26 |
| 5.2.6. Determinació del β -carotè | 27 |
| 5.2.7. Determinació de la vitamina E | 28 |
| 5.2.8. Bioaccessibilitat del β -carotè i la vitamina E | 29 |
| 5.3. Anàlisi estadístic | 29 |
| 6. RESULTATS I DISCUSSIÓ | 30 |
| 6.1. CARACTERITZACIÓ DE LA NANOEMULSIÓ I L'EMULSIÓ CONVENCIONAL | 30 |
| 6.1.1. Tamany de partícula i índex de polidispersió | 30 |
| 6.1.2. Potencial zeta | 31 |
| 6.1.3. Viscositat | 32 |
| 6.1.4. Color | 33 |

| | |
|---|----|
| 6.2. DIGESTIBILITAT DE L'OLI | 34 |
| 6.3.Bioaccessibilitat del β -carotè i la vitamina E | 36 |
| 6.3.1. β -carotè | 36 |
| 6.3.2. Vitamina E | 38 |
| 7.Conclusions..... | 41 |
| 8.Bibliografia..... | 43 |

1. RESUM

En els últims anys, els components bioactius són de gran interès en la indústria alimentària com en la població en general pels seus avantatges per a la salut; no obstant, molt d'ells són difícils d'incorporar en matrius alimentàries al ser liposolubles. Les nanoemulsions faciliten la incorporació d'aquests components als aliments.

Per tant, l'objectiu d'aquest treball és obtenir nanoemulsions amb una base d'oli de nous enriquit amb β -carotè i vitamina E en una fase aquosa d'alginat per la incorporació en diferents matrius alimentàries com la pera, el formatge i el gall d'indi. A més, es pretén analitzar les propietats físico-químiques i la digestibilitat de les nanoemulsions aplicades com a recobriments. També es determinarà la bioaccessibilitat del β -carotè i la vitamina E incorporats a les nanoemulsions.

Les nanoemulsions van presentar menor tamany de partícula i major lluminositat enfront l'emulsió convencional però no es van observar diferències significatives en el potencial zeta i la viscositat. Es va comprovar que el formatge és l'aliment amb major digestibilitat seguit del gall d'indi i la pera. En aliments recoberts, la pera és l'aliment on el β -carotè és més bioaccessible i el gall d'indi va ser el que presentava major bioaccessibilitat de vitamina E.

En conclusió, la nanotecnologia ens ha permès obtenir aliments rics en components bioactius com el β -carotè i la vitamina E per gaudir dels seus efectes beneficiosos.

1.RESUMEN

En los últimos años, los componentes bioactivos son de gran interés en la industria alimentaria como en la población en general por sus ventajas para la salud; muchos de ellos son difíciles de incorporar en matrices alimentarias al ser liposolubles. Las nanoemulsiones facilitan la incorporación de estos componentes en los alimentos.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es obtener nanoemulsiones con una base de aceite de nueces enriquecido con β -caroteno y vitamina E en una fase acuosa de alginato para la incorporación en diferentes matrices alimentarias como la pera, el queso y el pavo. A más, se pretende analizar las propiedades físico-químicas y la digestibilidad de las nanoemulsiones aplicadas como recubrimientos. También se determinara la bioaccesibilidad del β -caroteno y vitamina E incorporados en las nanoemulsiones.

Las nanoemulsiones presentaron menor tamaño de partícula i mayor luminosidad frente la emulsión convencional pero no se observaron diferencias significativas en el potencial zeta y la viscosidad. Se comprobó que el queso era el alimento con mayor digestibilidad seguido del pavo y la pera. En los alimentos recubiertos, la pera es el alimento donde el β -caroteno es más bioaccesible y el pavo fue el que presentaba mayor bioaccesibilidad de vitamina E.

En conclusión, la nanotecnología nos ha permitido obtener alimentos ricos en componentes bioactivos como el β -caroteno y vitamina E para disfrutar de sus efectos beneficiosos.

1.ABSTRACT

In recent years, the bioactive components generate a great interest on food industry and on population in general for their health benefits; however, most of them are difficult to incorporate into food matrices to be soluble. The nanoemulsions facilitate the incorporation of these food components.

Therefore, the aim of this work is to obtain nanoemulsions new base oil enriched with vitamin E and β -carotene in an aqueous phase by the addition of alginate in different food matrices such as pear, cheese and turkey. In addition, it aims to analyze the physical and chemical properties and the digestibility of nanoemulsions applied as coatings. Also determine bioaccessibility of β -carotene and vitamin E incorporated in nanoemulsions.

The nanoemulsions were smaller particle size and increased emulsion versus conventional lighting but without significant difference in the zeta potential and viscosity. It was found that the cheese is the food more digestible followed by turkey and pear. Food coated pear is the food where the β -carotene is most bioaccessible and the turkey was presented as the most bioaccessibilited vitamin E.

In conclusion, nanotechnology has enabled us to get foods rich in bioactive compounds such as β -carotene and vitamin E to enjoy its benefits.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. Components bioactius: β -carotè i vitamina E

Els components bioactius són substàncies nutritives o no nutritives que es troben a concentracions molt baixes als aliments que intervenen en el metabolisme secundari dels vegetals i poden tenir un impacte significatiu sobre la salut humana (Kris-Etherton et al., 2002).

Existeixen diferents grups de components bioactius entre els quals, es troben els carotenoids i les vitamines antioxidants.

2.1.1. β -carotè

Els carotenoids són pigments orgànics solubles en greixos, sintetitzats a les plantes i altres organismes com bacteries i fongs (Stahl et al., 2005). A la seva estructura contenen una cadena central de 40 carbonis amb enllaços simples i dobles intercalats i posseeixen diferents grups cíclics. Segons la seva composició química es classifiquen en carotens o xantofil·les. Els carotens tan sols contenen carboni i hidrogen (per exemple el β -carotè, el licopè, etc) i les xantofil·les contenen a més a més oxigen (per exemple la luteïna) i es formen inicialment per hidroxilació de carotens. Als carotenoids generalment se'ls anomena amb noms comuns que inclouen les variacions estructurals dels anells laterals, en especial la posició del doble enllaç (Martínez, 2003).

Els carotenoids són substàncies hidrofòbiques, liofíliques i amb excepció dels apocarotenals àcids són insolubles en aigua. Aquests es dissolen en solvents orgànics com acetona, alcohol, èter etílic, tetrahidrofuran i cloroform. Els carotens són més fàcilment solubles al èter de petroli i l'hexà mentre que les xantofil·les es dissolen millor en metanol i etanol. Aquests components al ser insolubles en aigua, la seva absorció es veurà incrementada amb la ingesta de greixos.

En plantes i animals, els carotenoids es troben en forma de cristalls en solució en medi lípids, en dispersió col·loïdal o en combinació amb proteïnes en fase aquosa, donant carotenoproteïnes (colors verds, blaus i grisos).

Els carotenoids són ingerits fonamentalment a través de fruites i verdures i en petites quantitats a partir de productes animals o d'additius alimentaris. Gairebé cinquanta

carotenoids poden ser absorbits i metabolitzats, però sol sis (α -carotè, β -carotè, licopè, zeaxantina, luteïna, β -criptoxantina) representen més del 95% dels carotenoids totals en sang i són els que habitualment s'investiguen (Álvarez-Cruz et al. 2011).

Dins del grup dels carotens, trobem el β -carotè que és un pigment vermell-taronja abundant en les plantes i les fruites. Són fonts particularment riques en β -carotè les pastanagues, el caqui, la papaia, la carabassa, l'advocat, meló, mango, remolatxa, espinacs, tomàquets; en general tots aquelles fruites, verdures i hortalisses de color vermell-taronja.

El β -carotè és un compost orgànic i químicament està classificat com un hidrocarbur bicíclic amb dos anells β -ionona als extrems de la molècula (Figura 1).

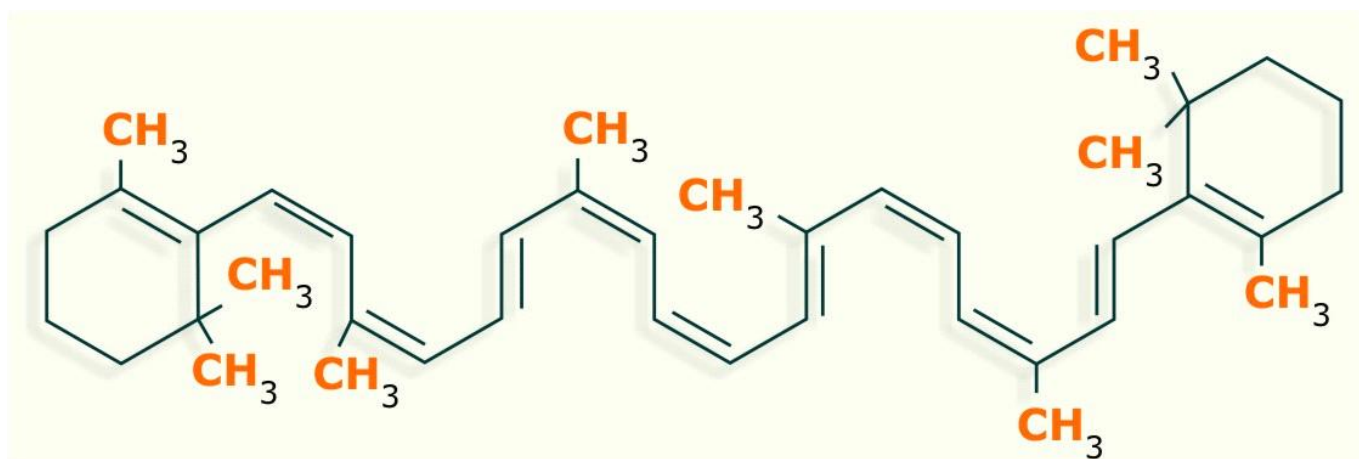


Figura 1. Molècula del β -carotè.

El β -carotè és un component bioactiu molt interessant ja que té molts efectes positius al nostre organisme com l'aspecte antioxidant, protegint dels radicals lliures prevenint d'algunes malalties cròniques generades per aquests radicals com les cardiopaties i el càncer, i millorant la resposta immune a infeccions. A més a més cal destacar que és el carotè amb major activitat provitamina A, ja que la seva molècula es divideix per la meitat i contribueix amb dues molècules de vitamina A. Cal destacar, que el β -carotè es troba en petites quantitats en l'aliment i a més a més s'absorbeix una petita part (Williams, 1998).

Es interessant incorporar a la nostra dieta aliments rics en β -carotè per tots els efectes positius i beneficis que ens pot aportar a l'organisme.

2.1.2.-Vitamina E

Per una altra, la vitamina E é una vitamina liposoluble que actua principalment com antioxidant dins del grup dels components bioactius.

Segons l'estructura la vitamina E es pot trobar en forma de tocoferols i els tocotrienols. El més abundant a la natura i el que té major activitat biològica és el α -tocoferol (Figura 2) que cal destacar el seu anell complex anomenat –croman- i una llarga cadena lateral (Carmen et al.2002).

La vitamina E està present en molts olis vegetals com poden ser el de germen de blat, el de gira-sol, de soja, de llavor de cotó; i productes derivats d'aquests olis, la maionesa i margarines. També nous, fulles verdes de les plantes i teixit adipós dels animals.

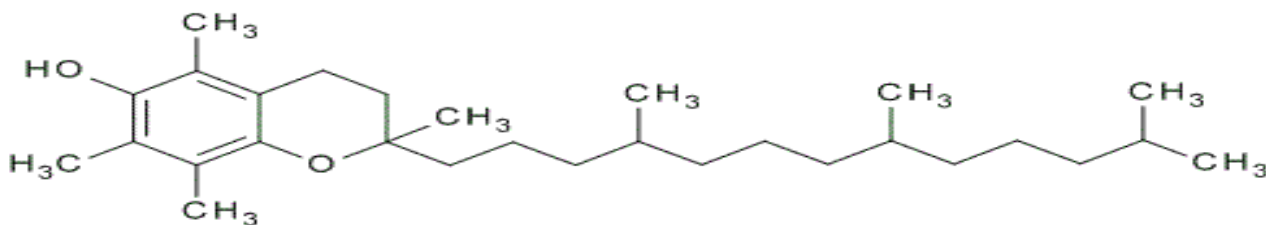


Figura 2. Molècula del α -tocoferol.

La seva absorció depèn de la capacitat de cada individu alhora d'absorbir greixos ja que aquesta es absorbeix a la porció mitja de l'intestí prim en presència de les sals biliars i la lipasa pancreàtica. S'absorbeix un 50% de la ingesta diària normal que serien uns 5-15 mg al dia. Aquesta s'emmagatzema principalment al teixit adipós i al fetge i s'elimina per la bilis i la resta per l'orina.

Pel que fa a l'estabilitat en els aliments, la vitamina E és molt estable en absència d'oxigen i lípids oxidables.

La vitamina E té un paper preventiu en processos patològics com l'Alzheimer, la demència senil, la pèrdua òssia, la sensibilitat i la resistència a la insulina, però cal tindre en compte que aquests resultats són obtinguts *in vivo* en animals d'experimentació.

Per tot el esmentat, és important que tant el β -carotè com la vitamina E puguin ser incorporats als aliments per gaudir dels seus avantatges i efectes beneficiosos pel nostre organisme.. Actualment, s'ha incrementat el desenvolupament de nous productes que contenen components bioactius, no obstant s'ha vist que són components difícils d'incorporar ja que són poc solubles en medi aquos i poc estables.

2.2. Nanotecnologia i nanoemulsions

En els últims anys la nanotecnologia no ha parat de créixer i es que aquesta tècnica crea i millora molts aspectes de molts camps de la ciència. La nanotecnologia es centra en l'estudi de fenòmens i la manipulació dels materials a escala atòmica, molecular i macromolecular, on les propietats difereixen considerablement de les observades a escales superiors. La nanotecnologia té molts camps d'aplicació i s'utilitza per la formació de productes però les aplicacions més importants avui en dia són les nanoemulsions i les nanocàpsules.

Gràcies als avanços de la nanotecnologia, s'ha experimentat que es pot reduir el tamany de les gotes que formen les emulsions, obtenint nanoemulsions. Les nanoemulsions són emulsions que a partir de tècniques i equips específics aconseguixen un diàmetre de partícula de 50-500nm. Aquestes poden ser un gran avanç per a les indústries ja que si s'apliquen als aliments, es pot incrementar la vida útil d'aquets, millorar les característiques sensorials (color,sabor,textura i olor), i augmentar la bioaccessibilitat dels components bioactius que contenen, permeten obtenir aliments funcionals enriquits amb bioactius més bioaccessible (McClements,2005).

Existeixen varis mètodes de formació de nanoemulsions que es classifiquen en mètodes d'alta energia o baixa energia. Els mètodes d'alta energia utilitzen dispositius que generen una força que barregen i alteren les fases d'oli i aigua formant petites gotes. Mecanismes d'alta energia poden ser el microfluiditzador, les vàlvules d'alta pressió i el sonicador.

Per una altra banda, els mètodes de baixa energia es basen en la formació espontània de petites gotes d'oli de la barreja d'oli en la fase aquosa quan les condicions ambientals, sistemes o la pròpia solució es veu alterada. Són exemples de mètodes de baixa energia la emulsificació espontània i la inversió de fases (McClements,2011).

Aquesta tecnologia permetrà desenvolupar famílies de nous ingredients funcionals i productes enriquits. També milloren les propietats com el color i la viscositat dels aliments. A més a més, les nanoemulsions faciliten la incorporació de components liposolubles en matrius aquoses.

Es per aquests motius que les nanoemulsions s'estan convertint en un substitutiu de les emulsions convencionals ja que aquestes presenten uns avantatges de molt pes en la indústria alimentària. Per una altra banda, les nanoemulsions són sistemes amb més estabilitat que permetran l'alliberació d'ingredients lipofílics encapsulats a l'interior de les gotes i que podran ser incorporats als aliments (Yue,2010).

En l'actualitat s'està investigant la producció de nanoemulsions riques en vitamines i en β -carotè amb la finalitat d'enriquir matrius alimentàries pobres en components bioactius.

2.3 Components d'una nanoemulsió

Les nanoemulsions estan constituïdes per una fase lipídica i una fase aquosa, en les quals pot haver dissolts estabilitzants (Salvia-Trujillo et al., 2011).

La fase lipídica en les nanoemulsions generalment actua com portadora de components actius lipofílics i és la fase dispersa en la fase aquosa continua. Generalment, els components actius lipofílics es solubilitzen en oli abans de la formació de nanoemulsions. La fase lipídica potser formulada amb diferents

components no polars com triglicèrids, olis minerals com el d'oliva, gira-sol i blat de moro, entre altres, i olis essencials (Odriozola-Serrano et al.,2014).

S'ha investigat que el tipus d'oli pot influir en les característiques fisicoquímiques de les nanoemulsions, també afectant al perfil nutricional i a la digestibilitat de les nanopartícules. Els triglicèrids de cadena llarga, digeribles, obtenen una major bioaccessibilitat de components bioactius en comparació amb els triglicèrids de cadena mitja o curta, no digeribles (Qian et al.,2012; Salvia-Trujillo et al.,2013).

Des del punt de vista nutritiu, els olis enriqueixen els aliments amb nutrients com àcids grassos. Els greixos i els olis contribueixen al transport i absorció de vitamines liposolubles en l'organisme i per tant, encara que siguin aliments molt calòrics, són bàsics i de gran importància ja que tenen que estar presents cada dia en l'alimentació i en quantitats adequades (Marcela et al.2010).

Per tant, un dels components més important en la nostra fase lipídica de la nanoemulsió és l'oli. Fina ara s'han elaborat nanoemulsions estables amb olis de gira-sol i oli d'oliva, però no hi ha cap estudi en el qual s'utilitzi oli de nous com a fase lipídica. . L'oli de nous s'obté del fruit del noguer per extracció mecànica en fred. Els olis de fruits secs, com per exemple, l'oli de nous o avellanes tenen un alt contingut de greixos monoinsaturats i poliinsaturats ω -6, però l'oli de nous, a més a més i a diferència dels altres olis de llavors, també és ric en ω -3(Figura 3).



Figura 3. Oli de nous

Els àcids grassos ω -3 posseeixen molts efectes beneficiosos per al nostre organisme durant la etapa de gestació i creixement ja és un component estructural del cervell i de la retina, i durant el desenvolupament del fetus, ajuden al seu creixement (Connor,1996). Avui en dia, es sap que aquest és essencial per al creixement i desenvolupament normal de l'ésser humà, però també juga un paper molt important en la prevenció i tractament de diverses malalties relacionades amb el sistema cardiovascular, el sistema immunològic i el sistema nerviós. En pacients amb malalties cardiovasculars tenen efectes antitrombòtics i antiarítmics prevenint l'arteriosclerosi al reduir les concentracions de colesterol en plasma (Simopoulos, 1999; Bruckner, 2000). A més a més, és molt important per al manteniment d'un correcte funcionament del sistema nerviós central i les seves funcions, sobretot en la etapa fetal i de creixement però també per un bon manteniment en la edat adulta. Aquest es concentra en la retina i al còrtex cerebral, i té una capacitat de corregir problemes visuals i cerebrals en pacients amb deficiència demostrada (Hoffman,2000).

Aquest contingut en ω -3 en oli de nous, té especial rellevància a nivell d'àcid linolènic, ja que les seves necessitats poden resultar més difícils de cobrir, sobretot si solament es consumeix aliments d'origen vegetal, ja que normalment, aquest àcid gras essencial el trobem majoritàriament als olis elaborats a partir d'aquests.

També cal destacar, que l'oli de nous té un contingut de greix saturat molt baix, el qual resulta molt beneficiós per als pacients dislipèmics i amb malalties cardiovasculars o inflamatòries (Botanical et al.,2014).

La fase aquosa de les emulsions pot contenir una varietat de constituents solubles en aigua, incloent minerals, àcids, bases, sabors, conservants, vitamines, sucres, tensioactius, proteïnes o polisacàrids.

En la formulació de nanoemulsions es requereix de l'ús d'estabilitzants com els surfactants i espessants per prevenir la desestabilització de l'estructura de la nanoemulsió una vegada esta formada(Odriozola-Serrano et al.,2014).

Els surfactants que s'utilitzen normalment per estabilitzar les nanoemulsions són la lactoglobulina, proteïnes de soia, lecitina i els diferents tipus de Tweens.

La lecitina és un component amb aparença de cera que adquireix una coloració groga al mantenir-se contacte amb l'aire i es capaç de formar una suspensió col·loïdal en l'aigua. La lecitina és molt abundant en la soia i en la clara d'ou i es utilitzada majoritàriament com emulsionant ja que posseeix un caràcter amfòter que facilita la formació de les emulsions tant O/W com emulsions W/O (Medina et al., 2013).

Es obtinguda principalment com un producte derivat de l'extracció d'oli de soia i composta per una barreja natural de fosfolípids, glicolípids, sucres, triglicèrids, àcids grassos i altres components en menor contingut. Aquesta s'aprofita de forma significativa en la indústria alimentària degut a les seves propietats tensioactives (Porras et al., 2008).

El Tween 20 o polisorbat 20, és un tensioactiu tipus polisorbat amb una estabilitat i relativa absència de toxicitat que permet utilitzar-lo com a detergent i emulsionant en nombroses aplicacions domèstiques, científiques, alimentàries, industrials i farmacològiques.

Els espessants augmenten la viscositat de la nanoemulsió i provoquen una disminució del moviment brownià de les partícules. En aquest grup es troben alguns midons modificats, cel·luloses modificades, alginats, pectines i extractes de fruites i verdures (Dickinson et al., 2003).

L'alginat és un polisacàrid derivat d'algues brunes d'origen marí que es troba formant part de la paret cel·lular de les algues, de forma anàloga a la cel·lulosa i la pectina en la paret cel·lular de les plantes terrestres (Mancini y McHugh, 2000). Aquest degut a les seves sals de metalls alcalins són solubles en aigua i formen gels ràpidament en presència de calci, els quals presenten unes característiques adequades per a ser utilitzats com a recobriments comestibles en la indústria alimentària.

Es sap, que un consum suficient de fibra al dia pot reduir el risc de malalties cardiovasculars, càncer de colon i obesitat (Chau i Huang 2004), una forma d'augmentar la quantitat de fibra en la dieta sense canviar els hàbits alimentaris, és consumir aliments enriquits a partir de fonts naturals de fibra ja que els consumidors

tendeixen a rebutjar additius sintètics. La búsqueda de fonts adequades per a enriquir aliments baixos en fibra és necessària (Betancur-Ancona et al.2013).

2.4. Recobriments comestible i aliments trossejats

Un recobrint comestible es defineix com una matriu continua i prima que s'estructura al voltant de l'aliment generalment mitjançant la submersió del mateix en una solució formadora del recobrint (García-Ramos et al., 2000).

Per la formació d'un recobrint comestible es necessita una solució que pugui donar lloc a una matriu estructural amb suficient cohesió(Debeaufort et al., 1998). Quant es combinen lípids, proteïnes i polisacàrids que poden interactuar física i químicament es poden obtenir recobriments amb millors propietats, sempre vigilant la compatibilitat d'aquests ja que podrien alterar el funcionament dels components del recobrint (Diab et al.,2001).

La majoria de projectes de recobriments a base de emulsions estan enfocats a conservar fruites i vegetals frescos, ja que la incorporació d'aquests recobriments redueix la intensitat respiratòria i la pèrdua d'aigua. A més a més produeixen una atmosfera modificada a la fruita, redueixen el deteriorament, retarden la maduració i els canvis de color, milloraren l'aparença, disminueix la pèrdua d'aromes, prevenen l'oxidació i el creixement microbià, redueix el intercanvi d'humitat i transporten estabilitzants de la textura i components bioactius (Olivas i Barbosa et al.2005).

Moltes d'aquestes substàncies bioactives presenten problemes de dispersió en la solució formadora de recobriments, degut al seu caràcter hidrofòbic; per tal raó, es necessari formar emulsions per la incorporació dels components lipídics en una fase aquosa. A més a més, contra més petit és el tamany de partícula més homogènia i estable serà la dispersió de les dues fases(Salvia-Trujillo et al; 2011). Es per aquesta finalitat que la nanotecnologia pot resultar de gran utilitat.

També podria ser una gran millora en la bioaccessibilitat dels components bioactius que continguin aquest recobrint. L'estudi de la incorporació dels components bioactius en forma de nanorecobriments encara està en els seus inicis. Això constitueix un repte per al sector alimentari i podria ser un avanç molt important en el desenvolupament dels productes d'alta qualitat.

Per un altra banda,els consumidors d'avui en dia exigeixen aliments frescos i mínimament processats amb mínima quantitat de substàncies químiques i requereixen i busquen aliments enriquits amb substàncies d'origen natural que aportin efectes beneficiosos per a la salut i que tinguin les característiques nutritives i sensorials dels productes primaris(Ponce et al.2008).

El formatge, la pera i el gall d'indi són productes que es consumeixen amb abundància en la població d'avui en dia. Actualment, la presentació de trossejat dels aliments ha sigut tot un èxit i la població compra més d'aquest format. Però, al estar trossejat és més fàcil que aquests tinguin pèrdues d'aigua, alteracions per microorganismes o oxidacions entres altres.

No existeixen estudis sobre l'aplicació de recobriments comestibles en formatge, ni pera ni gall d'indi tallat, però no obstant, aquesta aplicació podria ser una bona opció per a augmentar la vida útil d'aquests productes i a més a més fossin enriquits amb components bioactius que tindria encara més benefici per a la salut.

3. JUSTIFICACIÓ

Els components bioactius en especial el β -carotè i la vitamina E són difícils d'incorporar en els aliments ja que són components poc solubles en aigua , a més a més, aquests tenen una baixa bioaccessibilitat. Segons alguns estudis, les nanoemulsions podrien ser una bona proposta per facilitar la incorporació de substàncies actives liposolubles en diferents matrius alimentàries i augmentar la bioaccessibilitat d'aquests components liposolubles.

Tenint en compte que els components bioactius són substàncies de gran interès tant en la indústria alimentària com en la població en general, i que l'oli de nous és un aliment amb propietats nutritives, primerament s'ha proposat elaborar nanoemulsions amb propietats físico-químiques adequades a partir d'oli de nous enriquit amb β -carotè i vitamina E. Posteriorment, s'ha proposat incorporar aquesta nanoemulsió com a recobriments comestibles en tres matrius pobres en components bioactius com poden ser la pera, el formatge i el gall d'indi per incrementar les seves propietats funcionals. Considerant que la matriu alimentària que conté el component bioactiu pot interaccionar amb aquests, es pretén determinar i comparar la bioaccessibilitat del β -carotè i la vitamina E incorporats en els recobriments als tres aliments.

4. OBJECTIUS

4.1. Objectiu general:

L'objectiu general d'aquest estudi és obtenir nanoemulsions a base d'oli de nous enriquit amb components bioactius com el β -carotè i la vitamina E en una fase aquosa d'alginat per la seva futura incorporació en diferents matrius alimentàries com la pera, el formatge i gall d'indi. A més, s'analitzarà la bioaccessibilitat dels components bioactius i digestibilitat de les nanoemulsions aplicades com a recobriments a diferents matrius.

4.2. Objectius específics:


- * Definir les diferents propietats físico-químiques (tamany de partícula, potencial zeta, viscositat i color) de les nanoemulsions d'oli de nous enriquides amb β -carotè i la vitamina E.
- * Determinar la bioaccessibilitat del β -carotè i vitamina E de les nanoemulsions aplicades a les diferents matrius alimentàries.
- * Avaluar la digestibilitat de l'oli utilitzat pel recobriment a les diferents matrius alimentàries.

5. METODOLOGIA

5.1. Materials

Les emulsions consten de dues fases: la fase lipídica (oli de nous enriquit amb β -carotè i vitamina E) i la fase aquosa. A aquestes fases s'afegiran els estabilitzants. Dintre dels estabilitzants s'utilitzaran surfactants (tween 20 i lecitina) i espessants (alginat i fibra de mandarina).

L'oli de nous és l'encarregat de transportar els components bioactius de la mostra. Es caracteritza per ser un oli ric en greixos poliinsaturats com el ω -6 i ω -3 (Figura 4).



| Análisis nutricional: | Para 100g | Para 2 c. de café (10ml) |
|---|------------------|--------------------------|
| Valor energético: | 900 kcal/3700 kJ | 83 kcal/340 kJ |
| Proteínas | 0 g | 0 g |
| Glúcidos | 0 g | 0 g |
| de ellos, azúcares | 0 g | 0 g |
| Lípidos | 100 g | 9,2 g |
| Ácidos grasos saturados | 10 g | 0,9 g |
| Ácidos grasos insaturados | 90 g | 8,3 g |
| de ellos, ácido alfa-linolénico (omega 3) | 12 g | 1,1 g |
| Fibras | 0 g | 0 g |
| Sodio | 0 g | 0 g |

Figura 4. Composició nutricional del oli de nous

El β -caroté i vitamina E són els elements essencials d'aquest estudi. Aquests components bioactius s'incorporaran dins de la fase lipídica, és a dir, juntament amb l'oli de nous.

L'aigua milli-Q és una aigua ultra pura que ha estat sotmesa a osmosi inversa a partir d'aigua bidestil·lada i no permet el creixement microbià.

El Tween 20 és un agent tensioactiu que ens ajuda en la formació d'emulsions en els aliments. Aquest ha estat emprat per la seva afinitat als àcids grassos presents en el nostre oli de nous.

La lecitina és un component de coloració groga que és capaç de formar una suspensió col·loïdal en l'aigua. Aquest ha estat emprat per el seu poder emulsionant i la seva estabilitat.

L'*alginat* és un polisacàrid provinent d'algues d'origen marí que en presència d'aigua actua com a gelificant de l'emulsió, acció que ens proporcionarà estabilitat i espessor.

La *fibra de mandarina* ens ajudarà a estabilitzar l'emulsió. La fibra de mandarina és provinent del *Indulleida*, la seva recepció és en forma polvoritzada i es rica en fibra soluble.

5.2. Mètodes

5.2.1. Preparació de l'oli enriquit

Es van barrejar 100 mL d'oli de nous amb 0,25g de β -carotè i 0,25g de vitamina E. La barreja es va sonicar durant 1 minut i darrerament es va escalfar fins a 50°C durant 5 minuts. Aquest procés es va repetir dues vegades. Una vegada acabat el procés es va afegir l'oli enriquit al 0,25% en β -carotè i vitamina E en potets de 15-20mL i es va congelar ràpidament.

5.2.2. Preparació i formació de la nanoemulsió

a) Formació de l'emulsió convencional

Per una banda, es van introduir amb un pot de centrifuga 16g d'oli enriquit i 5g de lecitina, la barreja es va barrejar amb l'ultraturrax (Ultra-Turrax, Janke&Kunkel, Staufen, Germany) durant 5 minuts.

Per una altra banda, es van escalfar 500mL d'aigua milli-Q en un calefactor elèctric i quan l'aigua va assolir 80°C es van afegir 10g d'alginat. La barreja es va agitar durant 5 minuts a 9500rpm amb l'ultraturrax i posteriorment es va deixar refredar fins 20-25 °C. Una vegada assolida aquesta temperatura, es van afegir 2,5g de fibra de mandarina i 5 grams de Tween 20.

Per la formació de l'emulsió es van barrejar a l'ultraturrax durant 3 minuts 400mL de la barreja d'aigua, alginat, fibra de mandarina i Tween 20 amb l'oli i la lecitina. L'emulsió obtinguda posseeix 4% d'oli, 1% de lecitina, 1% de Tween, i 0,5% de fibra de mandarina.

b) Formació de la nanoemulsió

Per formar una nanoemulsió es va passar l'emulsió per l'aparell microfluidized (M-100P, Microfluidics, Newton, MA) que treballa a pressions molt altes (Figura 5). La pressió a la qual es va treballar amb l'equip va ser de 150 MPa. Aquest aparell conté una vàlvula que desvia la emulsió primària a una cambra on es sotmet a altes velocitats provocant que les partícules xoquin entre elles produint la reducció del tamany de partícula. Al sortir de l'interior, passa per un tub en forma d'espiral sotmès a gel i aigua que refredarà la emulsió i això farà que mai superi una temperatura de 20°C. Aquest procés s'efectuarà cinc vegades per arribar a tenir el tamany de partícula. Un cop obtinguda la nanoemulsió es procedeix a efectuar la caracterització i les digestions pertinents.



Figura 5. Microfluidized

5.2.3. Caracterització de la nanoemulsió i emulsió convencional

5.2.3.1. Tamany de partícula

El tamany de partícula de les nanoemulsions es va mesurar amb l'equip Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Aquest aparell mesura el tamany amb un sistema de llum dinàmica que capta el moviment de les gotes de tamany nanomètric i les relaciona amb el diàmetre hidrodinàmic (Figura 6).

Aquesta mesura es va realitzar a partir de cubetes de plàstic amb una capacitat aproximada de 2 mL en les quals afegim 100 micròmetres d'aigua milli-Q i 900 micròmetres de nanoemulsió.



Figura 6. Zetasizer

Cal tenir en compte, no deixar cap bombolla d'aire dins d'aquesta barreja ja que la lectura no seria la correcta i ens donaria resultats erronis. Per fer una caracterització

adequada s'han de fer tres lectures i tres repeticions de cada cubeta, és a dir 9 lectures en total. Per saber si la lectura es correcta s'ha de vigilar que la mida sigui menor a 500 nanòmetres.

Juntament amb la lectura del tamany de partícula, el zetasizer també va determinar el PDI, el índex de polidispersió, paràmetre que indica el nivell de homogeneïtat de la nanoemulsió.

Per una altra banda, el tamany de partícula de les emulsions convencionals es va mesurar amb l'equip Mastersizer (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). La mida de les partícules es va mesurar per mitjà de la dispersió de llum estàtica d'aquest aparell(Figura 7).

Les mostres es van diluir amb aigua milli-Q i es van agitar en la unitat de dispersió amb una velocitat de 1800rpm. Per tal de determinar la mida de les partícules de manera més exacta, es van realitzar tres mesures de cada emulsió convencional i el diàmetres de la mida de les partícules es va detallar com el diàmetre mig ponderat de superfície(d43).



Figura 7. Mastersizer

5.2.3.2. Potencial zeta

Per determinar el potencial Z de les nanoemulsions i emulsions convencionals es va fer anar el mateix aparell que es va utilitzar per avaluar el tamany de partícula de les nanoemulsions però amb unes cubetes amb elèctrodes als laterals (Figura 8). Es determina la càrrega superficial a la interfase de les petites gotes disperses en l'emulsió i si la càrrega es suficientment alta o baixa per assumir que les forces de repulsió entre les gotes són predominants en l'emulsió (< -30 mV ó > 30 mV) i per tant, no es produiran fenòmens de coalescència i es considera una emulsió estable.



Figura 8. Cubeta

Per a realitzar la lectura es van preparar 100 μl d'aigua milli-Q i 900 μl de la mostra. En aquest cas també tindrem un total de 9 lectures com amb el tamany de partícula, on els resultats obtinguts s'expressaran en milivolts (mV).

5.2.3.3. Viscositat

La viscositat es va realitzar amb l'equip SV-10 Vibro-Viscosimeter (A&D Company, Tokyo, Japan), el qual produeix unes vibracions de 30Hz amb una amplitud constant (Figura 9). Per determinar aquesta mesura, es van incorporar 10 ml de nanoemulsió o emulsió convencional a una cubeta específica per determinar viscositats i es va procedir a la lectura. Aquest procés com els altres explicats anteriorment, es van realitzar 3 vegades.



Figura 9. Viscosimeter

5.2.3.4. Color

El color es va mesurar mitjançant el colorímetre Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc, Osaka, Japan) que funciona a temperatura ambient (Figura 10). Es fan 3 lectures de color diferents. Els resultats s'expressen mitjançant les coordenades L^* , a^* i b^* que corresponen a:

L^* és un valor que ens descriu la lluminositat de la mostra i oscil·la entre 0 i 100. Més pròxim a 100 més lluminositat té la emulsió.

a^* determina la posició entre el verd i el magenta/vermell. Els valors negatius ens indicaran colors verdosos, mentre que els positius colors magenta/vermel·losos.

b^* determina la posició entre els colors groc i blau. Si aquests són negatius ens indicaran colors més blaus, mentre que si són positius seran més grocs.



Figura 10.Colorímetre

El color es va expressar com a índex de blancor i es calcula amb l'equació següent:

$$WI = 100 - ((100 - L)^2 + (a^2 + b^2))^{0,5}$$

5.2.4. Recobriment dels aliments

Primerament, es van preparar les mostres per poder ser recobertes. Per una banda, la pera i el formatge es van tallar en forma de cilindres amb un diàmetre 2cm d'amplada i 2cm d'alçada (Figura 11). En canvi el gall d'indi es va tallar en rodanxes de forma rectangular d'uns 4-5cm de llarg. Una vegada tallats 100g de cada aliment, els trossos es van submergir primer 2minuts en la nanoemulsió, es van deixar assecar 1 minut, i finalment es va submergir 2 minuts en una solució de clorur càlcic (2%). Cal destacar que la solució de clorur càlcic s'afegeix per que la nanoemulsió s'adhereixi correctament a la superfície de l'aliment

Per últim, es van guardar 50g d'aliment recobert amb una safata de plàstic al congelador per la seva posterior extracció i 50g es van utilitzar per dur a terme la digestió in vitro completa.



Figura 11. Material per al recobriment de l'aliment

5.2.5. Digestió in vitro de l'aliment recobert

- *Digestió de la boca*

Es van barrejar 10mL de mucina amb 10mL de la nostra mostra. Després es va ajustar el pH a 6,8 amb NaOH. Una vegada ajustat el pH la barreja es va col·locar al orbital durant 10 minuts a 37°C i 100rpm(Figura 12).



Figura 12. Orbital

- *Digestió de l'estómac*

Una vegada acabada la digestió de la boca, es van afegir 20mL d'un preparat de sals d'estómac format per NaCl i HCl i es va ajustar el pH a 2,5. Posteriorment, es va introduir la barreja al orbital 2hores a 37°C i 100rpm.

- *Digestió del intestí*

Una vegada finalitzada la digestió estomacal, es va introduir la mostra al bany maria a 37°C(figura 13), per simular la digestió de l'intestí prim, juntament amb una 2,6ml clorur càlcic(110 mg/ml) i 5,3 ml de bilis(47mg/ml). Abans de ficar en marxa la digestió intestinal d'intestí es va ajustar el pH de la barreja a 7 i es va afegir 3,3ml lipasa pancreàtica. Després de dues hores de digestió, es va anotar el volum de sosa gastat per neutralitzar l'acidesa produïda pels àcids grassos lliures(%AGL), alliberats per la lipasa durant la digestió. Aquest paràmetre ens indica el grau de digestibilitat de l'oli.



Figura 13. Digestor

Per calcular aquest percentatge es va utilitzar aquesta equació:

$$\text{FFA}(\%) = 100 \times \frac{V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} \times M_{\text{oli}}}{2 \times m_{\text{oli}}}$$

On:

V_{NaOH} : el volum de NaOH gastats en la digestió intestinal.

C_{NaOH} : la molaritat del NaOH (0,25M).

M_{oli} : el pes molecular de l'oli (800g/mol).

m_{oli} : pes total de l'oli inicial que hi ha en la barreja(g).

La mostra digerida es va centrifugar durant 40 minuts a 4000rpm i 4°C. El sobrenedant obtingut, part on està solubilitzat els components bioactius alliberats de la nanopartícula, es va agafar amb una pipeta Pasteur i es va congelar per la seva posterior extracció de β -carotè i vitamina E.

5.2.6. Determinació del β -carotè

La determinació es va efectuar tant de la fracció micel·lar com de l'aliment recobert. Per a determinar el contingut en β -carotè de les mostres, es van afegir 5ml de la mostra a 5ml de cloroform. Totes les mostres es van barrejar en un agitador mecànic durant 3 minuts aproximadament a 1800rpm i posteriorment es van centrifugar durant 15 minuts a 12500rpm a 23°C.

Finalitzada la centrifuga, es van obtenir dues fases diferents: la fase inferior composta per cloroform i β -carotè, i la superior, blanca i d'aspecte escumós que contenia l'oli i restes de β -carotè encapsulat.

La lectura es va efectuar de la part inferior que és on es trobava el β -carotè i es va introduir dins de l'espectòmetre (Ultrospec 3000pro GE HealthSciences, USA) a una absorbància de 450nm(Figura 14).



Figura 14.Espectòmetre

5.2.7. Determinació de la vitamina E

5.2.7.1. Extracció

L'extracció de vitamina E també es va efectuar tant de la fracció micel·lar com de l'aliment recobert.

Primerament, es van centrifugar 15mL de nanoemulsió amb 15mL d'hexà i metanol (60:40) durant 10 minuts a 12500rpm. El sobrenedant es va filtrar amb sulfat de sodi i el solvent es va evaporar al rotavapor durant 20 minuts a 30°C (Figura 15). Després, el residu es va barrejar durant 30 minuts en atmosfera de nitrogen amb 0,5 g d'àcid ascòrbic, 20mL metanol i 5mL de KOH. Després, aquesta barreja es va introduir en un embut de decantació amb 50 mL d'hexà. Passat un temps, es van formar dues fases dins de l'embut, la capa superior, que és la que té la vitamina E, es va evaporar fins a sequedat amb el rotavapor. Una vegada evaporat tot el líquid, el residu es van recollir amb hexà.



Figura 15.Rotavapor

5.2.7.2. Quantificació

La determinació de vitamina E es va realitzar per HPLC amb una columna de fase reversa C18, i es va eluir isocràticament amb una barreja de metanol/aigua (96:4 v/v). La detecció es va realitzar mitjançant un detector de fluorescència a una longitud d'ona de excitació de 296nm i una longitud d'ona d'emissió de 340nm. Per últim, cal esmentar que la duració de l'anàlisi cromatogràfic va ser d'uns 25 minuts aproximadament.

5.2.8. Bioaccessibilitat del β -carotè i la vitamina E

La bioaccessibilitat del β -carotè i la vitamina E es va determinar a partir de les concentracions de la nanoemulsió inicial i a la fracció micel·lar. Per calcular la bioaccessibilitat es va aplicar l'equació següent:

$$\text{Bioaccessibilitat} = 100 \times \frac{C_{\text{micel.lar}}}{C_{\text{digerida}}}$$

On:

$C_{\text{micel.lar}}$: concentració de β -carotè o vitamina E en la fracció micel·lar.

C_{digerida} : concentració de β -carotè o vitamina E en la nanoemulsió digerida.

5.3. Anàlisi estadístic

Els resultats obtinguts van ser analitzats amb el programa estadístic Statgraphics Centurion per a Windows (Statistical Graphics Co., Rockville, Md). Es va realitzar l'anàlisi de variància (ANOVA) per comparar les dades obtingudes amb un nivell de significació del 95%. El test utilitzat per establir diferències significatives entre les mitjanes va ser el de la mínima diferència significativa (Least Significant Difference-LSD).

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1. CARACTERITZACIÓ DE LA NANOEMULSIÓ I L'EMULSIÓ CONVENCIONAL

6.1.1. Tamany de partícula i índex de polidispersió

Es va avaluar el tamany de partícula de la nanoemulsió i de l'emulsió convencional (Taula 2).

Taula 2. *Tamany de partícula de la nanoemulsió i de l'emulsió convencional*

| MOSTRA | TAMANY DE PARTÍCULA(nm) |
|----------------------|-------------------------|
| Emulsió convencional | 85200 ±18530 |
| Nanoemulsió | 325,79±49,62 |

Com es pot observar a la taula 2, el tamany de partícula de la nanoemulsió ha estat menor que el de l'emulsió convencional, amb una mida de 325nm aproximadament. Com ja s'ha esmentat anteriorment, les nanoemulsions presenten un tamany de partícula entre 50 i 500 nanòmetres. Per tant, es confirma la correcta microfluidització de les emulsions ja que la nostra mesura s'inclou dins d'aquest rang.

A més de l'ús del microfluiditzador, hi ha varis estudis que demostren que la composició de la nanoemulsió afecta al tamany de les gotes. Ostertag et al. (2010), van comprovar que la quantitat el surfactant (Tween 20), influeix sobre el tamany de partícula. Quan la relació de surfactant oli és elevada el tamany de gota es menor, és a dir, es redueix el tamany de gota amb majors quantitats de Tween 20, ja que aquests surfactant permetrà una millor solubilització de l'oli en aigua i com a consegüent la reducció del tamany de les gotes de l'oli. A més a més, les nanoemulsions són més estables amb la presència d'agents tensioactius, ja que aquests presenten capacitat d'absorció en les superfícies de les gotes (Aranberri et al.2006).

El tamany de partícula de les nanoemulsions també es veu afectat amb la viscositat, a més viscosa és la nanoemulsió, més gran és el tamany de partícula (Walstra et al.1993).

L'índex de polidispersió és un paràmetre que ens indica el nivell d'homogeneïtat de les emulsions i aquest oscil·la entre 0 i 1. Un PDI alt, és a dir pròxim a 1, ens indicarà que aquella mostra és poc homogènia i si aquesta és pròxima a 0, ens indica que la mostra és homogènia i que aproximadament les nostres partícules són similars entre elles.

Taula 3.Índex de polidispersió(PDI) de la nanoemulsió i l'emulsió convencional

| MOSTRA | Índex de polidispersió(PDI) |
|----------------------|-----------------------------|
| Emulsió convencional | 0,57±0,18 |
| Nanoemulsió | 0,29±0,03 |

Com es pot observar en la taula 3, l'emulsió convencional és la mostra que presenta un índex de polidispersió més elevat (0,57±0,18) i per tant es considerada poc homogènia. La nanoemulsió és més homogènia i presenta partícules similars ja que el seu valor és més pròxim al 0.

6.1.2. Potencial zeta

Com es pot veure a la taula 4, els valors de potencial zeta són molt similars en les dues mostres, és a dir que no hi ha diferències significatives entre el potencial Z de l'emulsió convencional i la nanoemulsió.

Taula 4.Potencial zeta de la nanoemulsió i l'emulsió convencional

| MOSTRA | POTENCIAL ZETA(mV) |
|----------------------|--------------------|
| Emulsió convencional | -71,83±3,30 |
| Nanoemulsió | -68,09±3,43 |

Cal destacar que les dues mostres tenen valors negatius degut a la presència d'alginat, polisacàrid aniònic, i a més a més al surfactant (tween 20) que aporta grups negatius a la interfase de les gotes d'oli. En alguns experiments s'ha comprovat que el tween 20 aporta aquesta càrrega negativa a les gotes d'oli a causa de l'adsorció del hidroxil a partir de la fase aquosa o també podria ser per la presència d'impureses aniòniques com són els àcids grassos lliures (McClements,2005).

Altres estudis han suggerit que ajustant el pH entre 5 i 7 en dispersions s'incrementa el potencial zeta i la seva estabilitat (Garzon et al.,2009).

El potencial zeta és un paràmetre que ens permet conèixer la càrrega superficial de les partícules. Quan aquesta càrrega és superior a +30mV o inferior a -30mV, ens indica que les partícules es repel·leixen entre elles i són estables.

El fet que les nostres mostres presentin valors majors a -65 mV ens indica que tan l'emulsió convencional com les nanoemulsions són bastant estables , hi haurà menys probabilitats de que es formin agregats (Heurtaut et al., 2003).

6.1.3.Viscositat

La viscositat mesurada de les mostres es presenta a la taula5

Taula 5.*Viscositat de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional*

| MOSTRA | VISCOSITAT(mPas) |
|----------------------|------------------|
| Emulsió convencional | 208,66±10,85 |
| Nanoemulsió | 213,11±25,14 |

Com es pot observar en la taula 5, no hi ha diferències significatives entre els valors de la viscositat de l'emulsió convencional i la nanoemulsió ja que els resultats són molt pròxims.

Com ja s'ha vist anteriorment, l'alginat i la fibra de mandarina actuen com agents espessants i és per això que tant l'emulsió convencional com la nanoemulsió presenten valors alts de viscositat. L'alginat gràcies a les seves propietats espessidores i gelificants fa augmentar la viscositat de la mostra (Salvia Trujillo et al.2013). Fet que també passa amb les fibres, en augmentar les fibres augmenta la viscositat de la emulsió.

A més a més, la viscositat de les nanoemulsions es veu relacionada amb les molècules del surfactant (tween 20) i la quantitat d'oli, és a dir, quan la viscositat de l'oli disminueix, les molècules del tween 20 es mouen més ràpid i això produeix gotes més petites (Saber et al.2013).

En el cas de l'oli de nous, aquest és menys viscos que altres olis utilitzats, ja que la seva presentació és més líquida i això farà que la viscositat de les nanoemulsions elaborades a partir d'aquest oli presentin menor viscositat en comparació amb altres nanoemulsions a base d'altres olis. Segons alguns estudis les nanoemulsions a base d'oli de blat de moro presenten uns resultats de viscositat d'uns 450-458mPas, ja que aquest oli és més viscos.

6.1.4. Color

L'índex de blancor es va determinar tant a les emulsions convencionals com a les nanoemulsions. La blancor és un atribut de color amb alta reflectància lluminosa i baixa puresa situat en una regió relativament estreta del espai de color i al llarg de les longituds d'ona dominant entre 570nm i 470nm aproximadament(Rivas Bravo et al.,2014).

A la taula següent es presenten els resultats d'aquest índex:

Taula 6. *Índex de blancor de l'emulsió convencional i les nanoemulsions*

| MOSTRA | ÍNDEX DE BLANCOR(%) |
|----------------------|---------------------|
| Emulsió convencional | 40,97±0,47 |
| Nanoemulsió | 48,36±1,07 |

Com es pot observar a la taula 6, l'emulsió convencional té una menor índex de blancor que la nanoemulsió. Aquest fet es degut al pas de la nanoemulsió pel microfluiditzador, ja que la disminució del tamany de les gotes fa que la coloració de la nanoemulsió sigui més clara que l'emulsió convencional que és més fosca.

Estudis conclouen que les emulsions convencionals tendeixen a ser més tèrboles degut a que contenen gotes que tenen dimensions similars a la longitud d'ona de la llum i per tant es dispersen amb més facilitat. En canvi, les nanoemulsions tendeixen a ser menys tèrboles degut a que les seves gotes són més petites per l'efecte del microfluiditzador i es dispersen amb més dificultat (Qian i McClements et al.,2011).En conseqüència, les nanoemulsions són especialment adequades per l'aplicació de components lipofílics

que tenen que ser incorporats en aliments i begudes transparents (McClements et al.,2011).

A més a més, el menor tamany de les gotes de les nanoemulsions millora la seva estabilitat a la separació gravitacional i l'agregació de les gotes, el que fa augmentar la vida útil dels productes comercials (Qian i McClements,2011).

6.2. DIGESTIBILITAT DE L'OLI

La digestió es va valorar a través del percentatge d'àcids grassos lliures(%AGL) que indica la quantitat d'àcids grassos dels triglicèrids que s'han alliberat durant la digestió de les tres matrius recobertes. Per arribar amb aquest percentatge es va anotar el volum de sosa gastat durant la digestió intestinal.

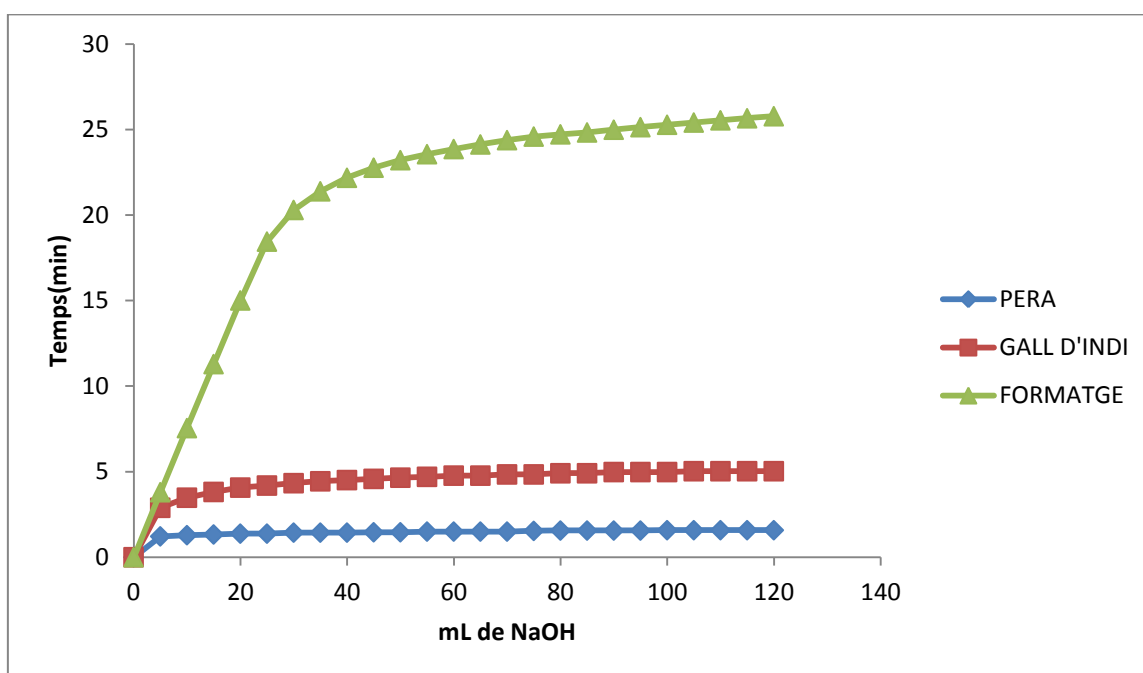


Figura 16. Mil·lilitres de sosa gastats durant la digestió intestinal

Es pot observar a la figura 16 que el formatge és l'aliment recobert que gasta més sosa durant la digestió intestinal per neutralitzar els àcids grassos lliures que conté. El formatge ha gastat més sosa durant la digestió ja que és l'aliment recobert que conté major quantitat de greix i és per això que necessita més quantitat de sosa per equilibrar el pH a 7 durant les dues hores de digestió intestinal. En els tres casos,

inicialment va haver un augment disparat que es va anant estabilitzant durant la primera hora fins a tenir uns valors constants.

Alguns estudis han experimentat també aquest augment brusc de la quantitat d'àcids grassos lliures durant els primers 40 minuts després de l'addicció de la lipasa pancreàtica durant la digestió intestinal. Seguidament d'un augment més lent i finalitzant amb una estabilització (Salvia-Trujillo et al.,2013).

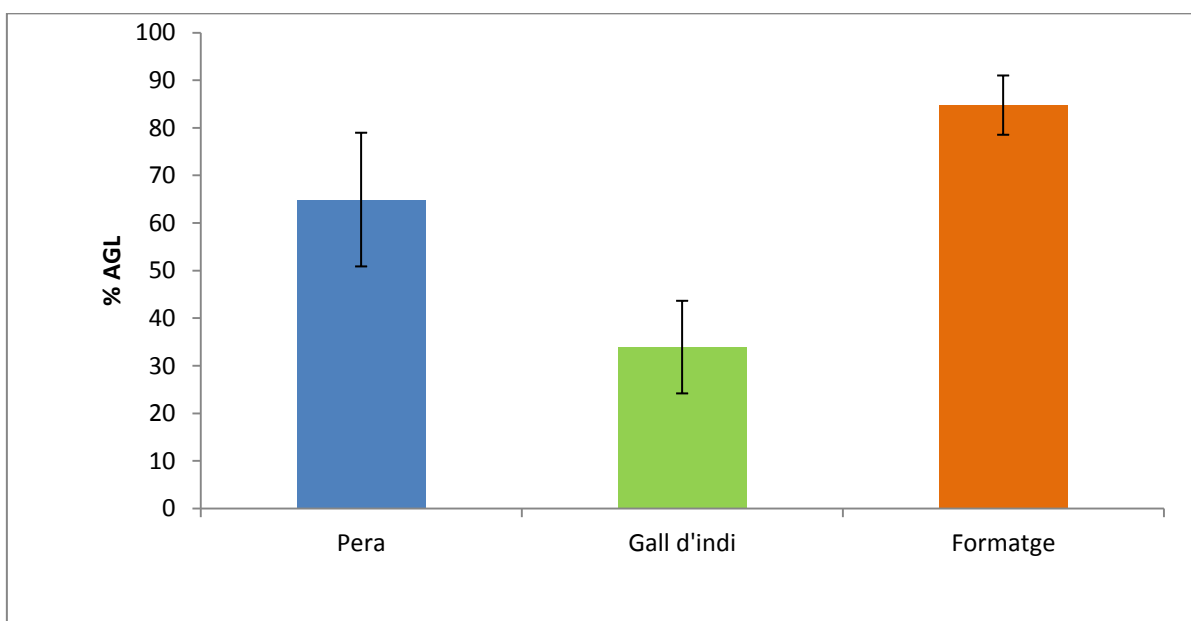


Figura 17. Percentatge d'àcids grassos lliures (FFA)

Com es pot veure a la figura 17, el formatge és el que té un major percentatge d'àcids grassos lliures seguint del gall d'indi i la pera per últim. Això és degut per el alt contingut de greix que conté el formatge i amb menys proporció el gall d'indi en comparació a la pera. No hi ha referències que ho indiquin, però potser el greix que comporta l'aliment ajuda a la digestibilitat de l'oli i ens justificaria l'ordre de les matrius dels percentatges d'àcids grassos lliures.

Alguns investigadors han observat que la velocitat i extensió de la digestió augmenta amb la disminució del tamany de gota que és atribuït a l'augment de l'àrea superficial dels lípids exposats a la lipasa pancreàtica amb la disminució del tamany de gota (Salvia-Trujillo et al.2013). És a dir, la quantitat d'àcids grassos lliures augmenta

conforme el tamany de gota disminueix ja que la lipasa pancreàtica va trencant els àcids grassos amb aquest augment de l'àrea superficial de l'oli durant la digestió intestinal.

Es sap que els àcids grassos de cadena mitja són capaços de migrar ràpidament a la fase aquosa mentre que els àcids grassos de cadena llarga tendeixen a acumular-se a la interfase oli-aigua inhibint l'activitat de la lipasa pancreàtica (Sek et al., 2002).

Per un altra banda, hi ha altres components que influeixen en la digestibilitat de l'oli de les nanoemulsions com poden ser els biopolímers. Alguns investigadors han observat que els biopolímers, en aquest cas l'alginat, redueix la velocitat de digestió formant un gel que redueix l'accés de les lipases (McClements et al., 2011). Si comparem els nostres resultats amb els obtinguts en altres treballs es pot afirmar que nanoemulsions que no tenen cap biopolímer tipus pectina, tenen menor digestibilitat que amb una nanoemulsió amb biopolímer.

A més a més, també està relacionat amb el surfactant. Alguns estudis proposen augmentar la quantitat d'oli i disminuir la quantitat de surfactant per la preparació de nanoemulsions ja que podria augmentar la quantitat d'àcids grassos lliures i a la vegada podria influir en l'absorció posterior dels components bioactius (Sage et al., 2012).

6.3. Bioaccessibilitat del β -carotè i la vitamina E

La bioaccessibilitat del β -carotè i la vitamina E es va calcular mitjançant la determinació del contingut d'aquests en la nanoemulsió digerida i en la fracció micel·lar per a cada una de les matrius estudiades.

6.3.1. β -carotè

Els valors de bioaccessibilitat del β -carotè van oscil·lar entre un 80-30% aproximadament. A la figura següent es recull els percentatges de bioaccessibilitat del β -carotè de cada aliment.

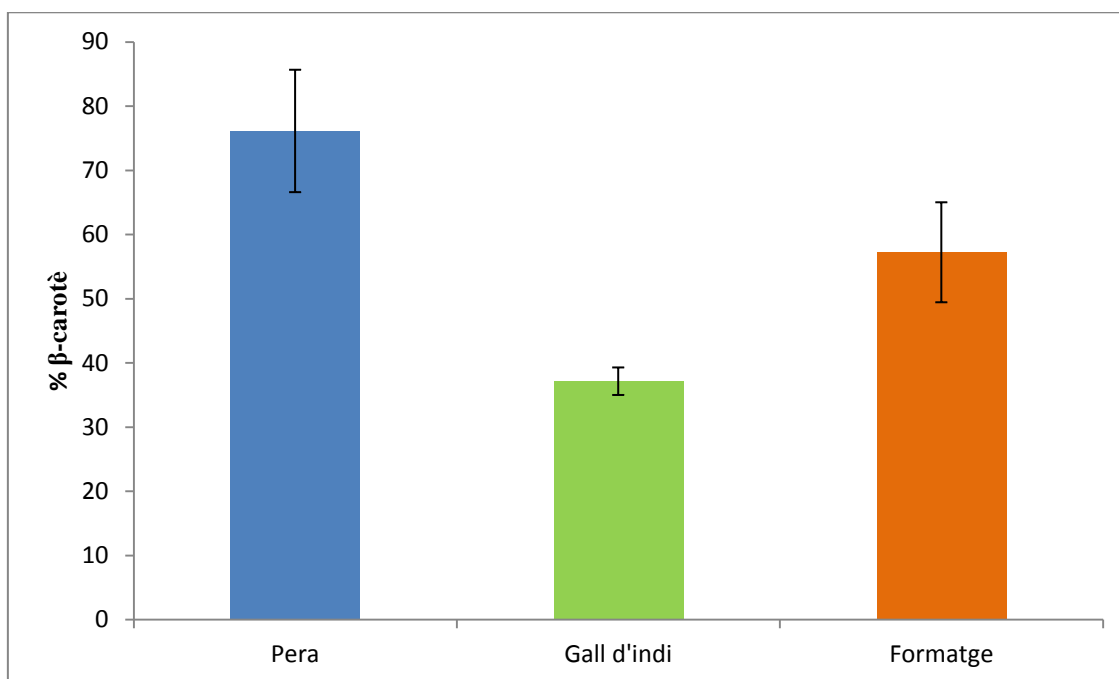


Figura 18. Bioaccessibilitat del β -carotè en les nanoemulsions de les tres matrius estudiades

Com es pot observar a la Figura 18, el β -carotè es més bioaccessible quan s'incorpora en el recobriment de pera seguint del formatge i per últim el gall d'indi.

L'ús del β -carotè està actualment limitat per la seva baixa solubilitat en aigua i la baixa biodisponibilitat oral. Alguns estudis indiquen que els carotenoids solubilitzats dins d'una fase d'oli són més bioaccessibles que els que formen cristalls (Xiao et al., 2015).

Liang et al., (2013) va observar que després de la digestió *in vitro* la bioaccessibilitat del β -carotè augmenta molt gràcies a la nanoencapsulació. El petit tamany de les gotes d'oli fa augmentar la superfície fet que permet tenir un major contacte amb la mucosa i un augment de la bioaccessibilitat. Per tant,, a menor tamany de gota de l'emulsió major bioaccessibilitat del component bioactiu solubilitzat a la gota (Salvia-Trujillo et al., 2013).

Segons estudis realitzats en el laboratori de forma paral·lela, la bioaccessibilitat del β -carotè en recobriment elaborats a partir d'emulsions convencionals és molt més baixa que les presentades en aquest estudi.

Els percentatges de bioaccessibilitat de β -carotè de les emulsions convencionals fetes a partir d'oli de nous, alginat, fibra de mandarina, tween 20 i els components bioactius β -carotè i vitamina E van comportar uns resultats d'un 53% per a la pera, un 17% per al gall d'indi i un 34% per al formatge. Com es pot observar, els resultats de bioaccessibilitat del β -carotè en emulsions convencionals són més baixes que les nanoemulsions del nostre estudi que oscil·len d'un 76% a un 37% el valor més baix. Fet que corrobora Salvia Trujillo(2013), que va investigar que contra menor tamany de gota major bioaccessibilitat. Tot i així, l'ordre de les matrius recobertes no varia segons són nanoemulsions o emulsions convencionals, segueix sent la pera l'aliment més bioaccessible en β -carotè.

La bioaccessibilitat del β -carotè també es veu incrementada amb l'augment del contingut d'oli digerible que s'atribueix a la capacitat de les micel·les mixtes formades per productes de la digestió per solubilitzar el β -carotè (McClements et al.,2013).

La composició i tipus d'oli també té una gran relació en la bioaccessibilitat d'aquest component ja que s'ha comprovat que la bioaccessibilitat del β -carotè en una nanoemulsió d'oli de taronja es molt baixa degut a la poca solubilització d'aquest oli en les micel·les mixtes. En canvi, en un oli ric en triglicèrids de cadena llarga, el β -carotè va presentar una bioaccessibilitat molt alta (Qian et al.,2012). Això ens pot corroborar a que les nostres matrius tenen un major percentatge de bioaccessibilitat de β -carotè enfront a altres perquè contenen oli de nous que aquest és ric en àcids grassos de cadena llarga.

6.3.2. Vitamina E

La bioaccessibilitat de la vitamina E es va determinar també a partir de les fraccions micel·lars i la nanoemulsió digerida de les tres matrius estudiades.

Com es pot observar a la figura 20, el gall d'indi és l'aliment que presenta la vitamina E més bioaccessible seguint del formatge i la pera.

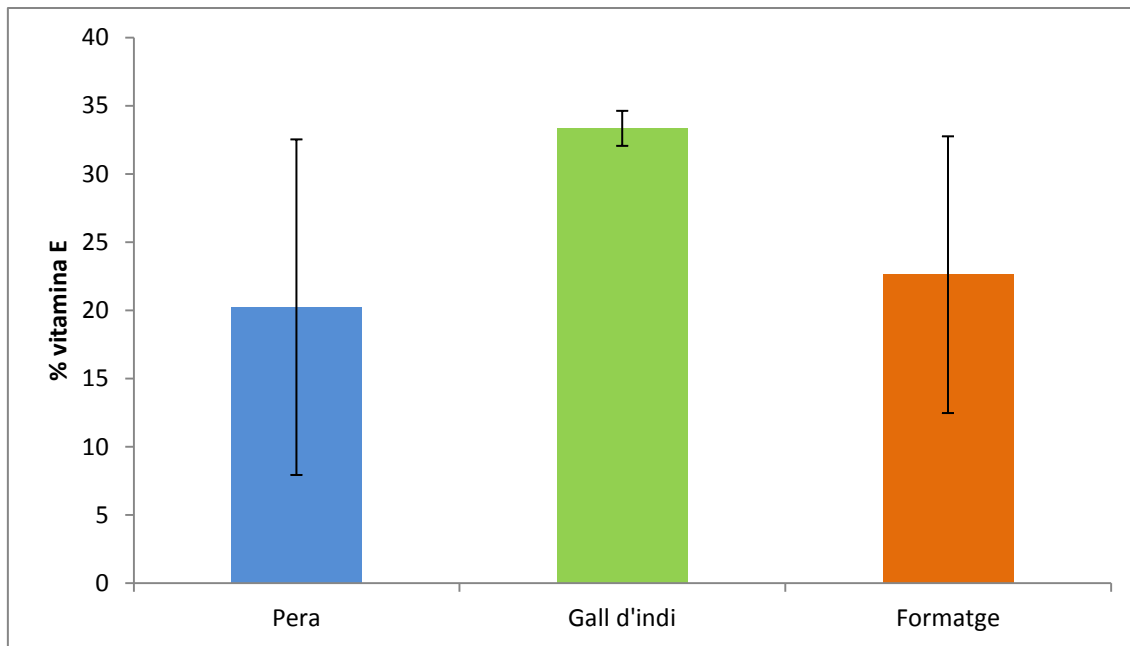


Figura 20. Percentatges de la bioaccessibilitat de la vitamina E en nanoemulsions de les tres matrius estudiades

Segons alguns estudis, la bioaccessibilitat de la vitamina E incorporada en nanoemulsions augmenta igual que es produeix una millora de les seves propietats antiinflamatòries tant pel α -tocoferol, δ -tocoferol i γ -tocoferol (Kuo et al., 2008).

El tipus d'oli també té un impacte considerable en la digestió de lípids i en la bioaccessibilitat de les vitamines liposolubles que s'atribueix a les diferències en la alliberació de components bioactius a partir dels gotes de lípids i la seva solubilització en les micel·les mixtes. És per això, que nanoemulsions preparades amb olis rics en triglicèrids de cadena llarga són més eficaços per incrementar la bioaccessibilitat de les vitamines liposolubles (McClements et al., 2015).

Alguns investigadors han observat que la bioaccessibilitat de la vitamina E augmenta més en nanoemulsions riques en àcids grassos de cadena llarga que en nanoemulsions riques en àcids grassos de cadena mitjana, fet que s'atribueix a la major capacitat de solubilitzar les micel·les mixtes formades a partir dels àcids grassos de cadena llarga (McClements et al., 2013). Fet que corrobora els nostres resultats ja que el nostre oli utilitzat és ric en àcids grassos de cadena llarga.

A més a més, altres estudis han investigat que els agents tensioactius com el Tween ajuda a millorar aquesta bioaccessibilitat de la vitamina E en l'aliment recobert (Ying Yang et al.,2013).

Per una altra banda, Yang Y(2015) va investigar que la bioaccessibilitat de la vitamina E a més a més d'augmentar en presència d'àcids grassos de cadena llarga i disminuir en nanoemulsions riques en àcids grassos de cadena mitjana, també va observar que augmentava en presència de calci i fosfolípids.

7. Conclusions

- ❖ Les nanoemulsions presenten mides de partícula menors que l'emulsió convencional, arribant a valors nanomètrics. A més a més, a mesura que s'augmenta les concentracions de surfactant, el tamany de partícula es redueix.
- ❖ Les nanoemulsions tenen un índex de polidispersió (Pdl) menor que l'emulsió convencional, considerant així que les nanoemulsions al tenir valors més pròxims a 0 siguin més homogènies.
- ❖ No hi ha diferències significatives en el potencial zeta entre les nanoemulsions i l'emulsió convencional. A més a més, l'alginat i el tween 20 actuen aportant grups negatius que fan disminuir el potencial zeta.
- ❖ No hi ha diferències significatives en la viscositat de les nanoemulsions i l'emulsió convencional. La viscositat està relacionada les propietats espessidores de l'alginat i a més a més de la fibra de mandarina.
- ❖ Les nanoemulsions tenen una major lluminositat que les emulsions convencionals degut pel pas del microfluiditzador i per ser menys tòrbides, fet que seria de gran utilitat a la indústria alimentària en begudes i aliments.
- ❖ El formatge presenta major percentatge d'àcids grassos lliures seguint del gall d'indi i la pera. Això indica que la lipasa actua millor en el formatge alliberant més àcids grassos lliures.

- ❖ La pera és l'aliment que presenta el β -carotè més bioaccessible. En canvi, és el gall d'indi l'aliment que presenta la vitamina E més bioaccessible seguint del formatge i la pera.
- ❖ Aplicar recobriments comestibles a matrius alimentàries pobres en components bioactius com la vitamina E i el β -carotè, pot ser una bona estratègia per a augmentar i millorar el valor nutricional dels aliments.

8. Bibliografía

- Álvarez Cruz N.S. & Bague Serrano A.J. Los alimentos funcionales: una oportunidad para una mejor salud. 155-188.2011
- Aranberri I, Binks BP, Clint JH, Fletcher PDI. Elaboracion Y Caracterización De Emulsiones. Rev Iberoam Polímeros. 2006; 7(3):211–31.
- Castro-González MI. Ácidos grasos omega 3: Beneficios y fuentes. Interciencia. 2002. p. 128–36.
- Dickinson, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloid.2003. 17,25-39
- Kris- Etherton, Hecker, Bonamone A, Coval, Binkoski. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. American Journal of Medicine 2002. 30;113 Suppl 9B:71S-88S
- Kuo F, Subramanian B, Kotyla T, Wilson T a., Yoganathan S, Nicolosi RJ. Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. International Journal of Pharmaceutics. 2008. p. 206–13.
- Liang R, Shoemaker CF, Yang X, Zhong F, Huang Q. Stability and bioaccessibility of ??-carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013. p. 1249–57.
- Li Y, Hu M, Du Y, McClements DJ. Controlling lipid nanoemulsion digestion using nanolaminated biopolymer coatings. Journal of microencapsulation. 2011. p. 166–75.
- Li Y, Zheng J, Xiao H, McClements DJ. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. Food Hydrocolloids. 2012. p. 517–28.

- Martínez A. Universidad de antioquia. Carotenoides. 2003
- Mayer S, Weiss J, McClements DJ. Behavior of vitamin E acetate delivery systems under simulated gastrointestinal conditions: Lipid digestion and bioaccessibility of low-energy nanoemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013. p. 215–22.
- McClements, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* 2011, 7(6), 2297.
- McClements, D. J. Food emulsions: principles, practices and techniques. 2005
- McClements DJ. Handbook OF Industrial Water Soluble Polymer. 2005
- Medina Canseco. Evaluación del efecto tensioactivo de lecitina natural aplicada en la elaboración de emulsiones farmacéuticas. Junio, 2013
- Odriozola-Serrano I, Oms-Oliu G, Martin-Belloso O. Nanoemulsion-Based Delivery Systems to Improve Functionality of Lipophilic Components. *Front Nutr* [Internet]. 2014; 1(December):1–4.
- Olivas GI, Barbosa. Edible coating for fresh-cut fruits. *Crit.Rev.Food Sci.Nutri* 45:657-670. 2005
- Ozturk B, Argin S, Ozilgen M, McClements DJ. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. 2015
- Pasin BL. encapsulación : caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales.
- Qian C, Decker EA, Xiao H, McClements DJ. Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on carotene bioaccessibility. *Food Chemistry*. 2012. p. 1440–7.
- Qian, C., & McClements, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids* 2011, 25(5), 1000–1008.

- Rao J, Decker EA, Xiao H, McClements DJ. Nutraceuical nanoemulsions: Influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β -carotene bioavailability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013. p. 3175–83.
- Revista chilena de nutrición - ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 (EPA Y DHA) Y SU APLICACIÓN EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICAS.
- Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements D J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science* 2013, 391, 95–102.
- Salvia Trujillo, J. Kim, Y. Parque, H.Xiao, DJ McClements. El tamaño de gota y la composición de nutraceuticos nanoemulsiones influencias biodisponibilidad de los ácidos grasos de cadena larga y la coenzima Q10.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements D J. Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry* 2013, 141(2), 1472–80.
- Salvia-Trujillo L, Qian C, Martín-Belloso O, McClements DJ. Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food Chemistry*. 2013. p. 878–84.
- Salvia Trujillo, Rojas Grau, Soliva Fortuny, Martin Belloso. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids* 2013, num.30:p.401-407.
- Schneider GS. OBTENCIÓN DE MICRO Y NANO HIDROGELES TERMOSENSIBLES EN BASE A POLI (N-ISOPROPILACRILAMIDA) Y ALGINATO. 2012
- Sen Gupta S, Ghosh M. Formulation development and process parameter optimization of lipid nanoemulsions using an alginate-protein stabilizer. *Journal of Food Science and Technology*. 2014.
- Sensoriales MY, Castilla DEMDE, Glaucus R, Almacenamiento BEN. Efecto de recubrimientos comestibles emulsionados sobre atributos de calidad fisicoquímicos, nutraceuticos, microbiológicos y sensoriales de mora de castilla. 2014

- Walstra, P. Principles of emulsion formation. Chemical Engineering Science. 1993. 48:333-349
- Xia Z, McClements DJ, Xiao H. Influence of physical state of β -carotene (crystallized versus solubilized) on bioaccessibility. 2015
- Yang Y, McClements DJ. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. Food Chemistry. 2013. p. 473–81.
- Ying Yang, David Julian, McClements DJ. Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. 2013

